



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12Q 1/68, A61K 48/00, C12N 15/88</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 96/01327</b>  (43) Date de publication internationale: 18 janvier 1996 (18.01.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00891  (22) Date de dépôt international: 4 juillet 1995 (04.07.95)		(81) Etats désignés: AU, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Données relatives à la priorité: 94/08220 4 juillet 1994 (04.07.94)		FR	Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): LABIMAP S.A. [FR/FR]; 59, rue Pierre-Curie, Boîte postale 3, F-78373 Plaisir Cédex (FR).  (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant ( <i>US seulement</i> ): DAVID, Fabrice [FR/FR]; 4, rue des Flambertins, F-95130 Franconville (FR).  (74) Mandataires: ORES, Irène etc.; Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).			

(54) Title: NUCLEIC ACID SEQUENCE AMPLIFICATION METHOD

(54) Titre: METHODE D'AMPLIFICATION DE SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES

## (57) Abstract

A nucleic acid target sequence amplification method using oligonucleotide primers consisting of a 3' portion hybridisable with said target sequence, and a 5' portion including at least one inverted repeat capable of being folded into a hairpin structure.

## (57) Abrégé

L'invention est relative à une méthode d'amplification d'une séquence-cible d'acide nucléique, qui met en œuvre des amorces oligonucléotidiques constituées d'une partie (3') pouvant s'hybrider avec ladite séquence-cible, et d'une partie (5') comprenant au moins une séquence répétée inversée pouvant se replier pour former une structure en épingle à cheveux.

***UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION***

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

## METHODE D'AMPLIFICATION DE SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES.

L'Invention est relative à une méthode d'amplification de séquences-cible d'acides nucléiques, et à ses applications.

5 On utilise pour détecter, identifier et doser des acides nucléiques particuliers, des séquences d'acides nucléiques complémentaires des séquences recherchées, qui se fixent spécifiquement sur celles-ci par hybridation. De telles sondes sont rendues  
10 détectables et/ou dosables grâce à un marquage particulier. Ce marquage peut être réalisé par incorporation d'isotopes radioactifs ou de méthodes chimiques ou biochimiques.

15 Dans le cas où l'on utilise des sondes marquées par une méthode non-radioactive (sondes froides), il est nécessaire, la plupart du temps, d'augmenter artificiellement de façon spécifique la concentration de l'ADN (Amplification) avant de pouvoir le détecter grâce à la fixation de ces sondes marquées.

20 Dans la description qui va suivre, on se référera essentiellement à la détection de séquences d'ADN ; il est entendu que ceci concerne également la détection d'ARN, puisque la conversion préalable de l'ARN en ADN est possible grâce à une enzyme : la transcriptase  
25 inverse.

Parmi les réactions d'amplification décrites, on doit citer la réaction de polymérisation en chaîne ou amplification génique, (P.C.R.). Grâce à la PCR, il est possible de multiplier la quantité d'une séquence  
30 nucléique donnée par un facteur atteignant un million de fois ou plus. Sa sensibilité est donc extrêmement élevée : on peut détecter une seule copie d'une séquence nucléique donnée. De ce fait, la PCR a permis d'obtenir d'importantes avancées, notamment dans le domaine de  
35 l'identification et de l'étude des gènes.

Cependant, cette sensibilité extrême devient parfois gênante, d'autant que les produits d'amplification (amplicons) sont souvent de petite taille et peuvent facilement contaminer les laboratoires.

5 Quelques amplicons suffisent ainsi pour contaminer les échantillons non encore testés ou les réactifs et produire ainsi des faux positifs.

La petite taille des produits d'amplification est aussi un désavantage dans le cas de tests utilisant 10 la technique dite d'amplification *in situ*. En effet, les amorces utilisées et les produits d'amplification ont des tailles de même ordre de grandeur (typiquement 30 paires de bases pour les amorces, et 200 paires de bases pour les amplicons). Dans la technique d'amplification *in situ*, on traite des cellules fixées sur des lames de microscope (ou fixées sur un support convenable, ou bien en suspension dans un milieu convenable) de façon à ce qu'une réaction d'amplification spécifique d'un ADN contenu dans ces cellules puisse avoir lieu. Par exemple, 15 on utilise cette méthode pour détecter la présence d'un virus donné. Ensuite on identifie les cellules positives par leur fluorescence en présence d'un colorant spécifique de l'ADN ou par une étape d'*hybridation in situ* suivant l'étape d'amplification.

20 Un des problèmes les plus difficiles à surmonter lors de la mise en oeuvre de la technique d'amplification *in situ* provient du fait qu'il est nécessaire de perméabiliser les membranes cellulaires par un traitement approprié de façon à ce que les amorces puissent diffuser au travers de la membrane pour atteindre l'ADN cible. Du fait de la taille voisine des amplicons et des amorces, les amplicons ont alors tendance à diffuser à travers les membranes au fur et à mesure que l'amplification se déroule ; on perd ainsi en 25 sensibilité et en contraste lors de l'observation au

microscope ou à l'aide d'un appareil de comptage automatisé des cellules.

D'autre part, la PCR, de même que d'autres techniques d'amplification exige un dispositif capable de déplacer la température du milieu réactionnel entre trois températures de travail : en général 55°C (hybridation des amorces), 72°C (extension des nouveaux brins d'ADN par la polymérase thermostable), et de 94°C (dénaturation des nouveaux brins). La LCR (ligase chain reaction) utilise elle aussi un tel dispositif programmable pour faire varier la température (thermocycleur).

Il existe des techniques fonctionnant à une seule température, mais elles utilisent plusieurs enzymes de différents types, et leur relative complexité n'a pas permis qu'elles obtiennent la diffusion qu'elles méritaient.

Il arrive en outre que pendant la période du cycle où la température est basse (55°C) dans les tubes, les amorces s'hybrident de façon non-spécifique à d'autres séquences que la séquence recherchée. On observe alors la formation de produits d'amplification parasites. L'utilisateur risque d'être induit en erreur s'il se contente d'effectuer un contrôle par électrophorèse sur gel d'agarose ou d'acrylamide, et que les fragments obtenus ont une taille apparente voisine de celle du fragment attendu.

Si l'on augmente la température d'hybridation de façon à éviter ces mésappariements évoqués plus haut, alors le rendement d'amplification diminue de façon considérable.

En outre, il est délicat d'effectuer des dosages à l'aide de la PCR : en effet, l'amplification de l'ADN ayant lieu selon une loi logarithmique, de faibles variations des conditions opératoires auront des effets très importants.

Il apparaît donc que bien que la PCR soit irremplaçable pour de nombreuses applications, en particulier dans le cadre de la recherche, les défauts énumérés plus haut limitent son utilisation pour des tests de routine.

Pour les applications médicales, une sensibilité extrême ne présente toutefois, dans la plupart des cas aucun avantage spécifique, en particulier, pour les méthodes de dépistage. Par exemple dans le cadre du dépistage des infections virales, la détection de quelques dizaines de copies d'un ADN viral est d'une valeur diagnostique incertaine dans l'état actuel de nos connaissances médicales. Une infection par un virus donné se traduit en réalité par la présence de plusieurs dizaines de milliers à plusieurs milliards de copies par échantillon.

L'auteur a contribué à démontrer, dans le cas de l'infection au virus HIV, que l'hybridation avec des sondes radioactives sans amplification donnait déjà des résultats supérieurs aux techniques immunologiques (Detection of H.I.V. Sequences by DNA hybridization, S. Berriche, F. David, V. Ganne, M. Mariotti et G. Lucotte. Molecular probes ; Technology and medical application, Raven press, New York 1989). Pour obtenir les mêmes résultats avec les sondes froides, une amplification de l'ADN cible de quelques ordres de grandeurs est un objectif suffisant.

L'Invention a pour objet une méthode d'amplification d'une séquence-cible d'acide nucléique, au moyen d'une ADN polymérase, caractérisée en ce qu'elle met en oeuvre l'extension d'au moins une amorce oligonucléotidique constituée d'une partie (3') pouvant s'hybrider spécifiquement avec la séquence-cible, et d'une partie (5') comportant au moins une séquence répétée inversée.

On entend par "séquence-cible" toute séquence d'acide nucléique que l'on souhaite amplifier : il peut s'agir au départ d'ADN aussi bien que d'ARN ; il peut également s'agir d'une séquence simple-brin ou double-brin.

Les parties des amorces complémentaires de l'ADN cible peuvent correspondre à des régions de celui-ci séparées de quelques dizaines à quelques milliers de nucléotides. Les amorces sont généralement utilisées par paires, orientées de telle sorte que la réPLICATION se fasse en allant de l'une vers l'autre, (Figure 1, Figure 5b et 5f).

La partie complémentaire de la séquence-cible peut présenter les caractéristiques (longueur, pourcentage de mésappariements toléré) de n'importe quel oligonucléotide utilisable pour une amplification par PCR de ladite séquence-cible. Ces caractéristiques dépendent essentiellement des conditions expérimentales dans lesquelles on souhaitera opérer. Par exemple, il est particulièrement avantageux, si on souhaite améliorer la spécificité de la réACTION, d'effectuer l'hybridation à une température de l'ordre de 60°C, c'est-à-dire supérieure à celle qui est habituellement utilisée pour la PCR, et avec une séquence complémentaire de l'ADN cible un peu plus longue que dans le cas des amorces généralement utilisées pour la PCR. Préférentiellement, cette séquence complémentaire de l'ADN cible a une longueur comprise entre 40 et 60 pb.

Les séquences répétées inversées (également dénommées séquences palindromiques) permettent un auto-appariement pour former une structure double-brin en forme d'épingles à cheveux.

Les séquences répétées inversées des deux amorces mises en oeuvre peuvent être identiques ou différentes entre elles ; de préférence, elles seront différentes, pour éviter une hybridation entre ces

amorces. Les séquences répétées inversées peuvent mesurer de quelques dizaines à plusieurs centaines de paires de bases. La température de fusion de la structure double-brin en forme d'épingles à cheveux résultant de l'appariement de ces séquences sera de préférence inférieure de quelques degrés à la température de fusion de la partie de l'amorce s'hybridant spécifiquement avec la cible ; elle peut ainsi être inférieure de 1 à 30°C, de préférence de 5 à 20°C, et avantageusement de 10°C environ.

La méthode conforme à la présente invention sera dénommée ci-après réaction d'amplification par accroissement génique.

Pour mettre en oeuvre cette méthode, on peut par exemple chauffer à 95°C un mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester, les amorces, telles que définies ci-dessus, spécifiques de la séquence génétique recherchée, une ADN polymérase, les quatre nucléotides triphosphates, et des sels et des réactifs assurant des conditions opératoires optimales pour l'ADN polymérase. On refroidit ensuite le milieu réactionnel à une température permettant l'hybridation des amorces dans des conditions de spécificité suffisantes (cette température dépend de la séquence et de la longueur des amorces), pour permettre l'elongation par l'ADN polymérase.

De manière générale, les réactifs et les conditions réactionnelles utilisables pour mettre en oeuvre l'amplification par PCR le sont également pour la mise en oeuvre du procédé selon l'Invention.

Une amorce s'hybride à chacun des brins d'ADN (Figure 5b). L'ADN polymérase utilisée se fixe sur le complexe ADN cible/amorce et commence l'elongation d'une nouvelle chaîne d'ADN, (Figure 5c). Après un temps convenable (quelques minutes par exemple, de façon à permettre une elongation suffisante de la chaîne néosynthétisée pour inclure la totalité de la séquence-

cible), on chauffe la solution de façon à séparer la matrice de la chaîne néo-synthétisée (Figure 5e).

On obtient ainsi une chaîne d'ADN qui comprend l'un des brins de la séquence-cible, flanqué en 5' d'une 5 ou plusieurs séquences répétées inversées, appartenant à l'un des membres (P1) de la paire d'amorces. L'autre membre (P2) de la paire d'amorces s'hybride au brin nouvellement synthétisé, et l'ADN polymérase peut répliquer ce brin de nouveau, (Figure 5f). En arrivant à 10 la fin du brin, l'ADN polymérase se décroche.

Le produit résultant de cette étape d'amplification est constitué par une molécule d'ADN comprenant la séquence-cible, ladite molécule d'ADN, étant double-brin sur au moins la longueur de cette 15 séquence-cible, l'extrémité 5' de l'un des brins étant constituée par la ou les séquences répétées inversées appartenant à l'amorce P1 (l'extrémité 3' étant constituée soit par une extrémité de la séquence-cible, soit par une séquence qui était adjacente à la séquence- 20 cible dans le fragment d'ADN qui comprenait cette séquence-cible), et l'extrémité 5' de l'autre brin étant constituée par la ou les séquences répétées inversées appartenant à l'amorce P2, et son extrémité 3' étant constituée par la ou les séquences répétées inversées 25 appartenant à l'amorce P1 (Figures 5h et 5i).

Cette molécule d'ADN sert à la fois de matrice et d'amorces pour les étapes suivantes de l'amplification. A partir de ce moment, et contrairement à ce qui se passe dans le cas de la PCR, l'amplification 30 se déroule de façon spontanée et à température constante.

En effet, sous l'effet de l'agitation thermique, la (ou les) séquence(s) palindromique(s) qui termine(nt) le double brin d'ADN entre(nt) dans un équilibre dynamique entre deux formes : Double-brin 35 normal  $\leftrightarrow$  double épingle à cheveux (Figures 5h et 5i).

L'ADN polymérase peut se fixer à l'extrémité 3' de l'un des brins replié en double épingle, et commencer à le répliquer, en utilisant comme amorce l'extrémité repliée(Figure 5j). Ce faisant, elle déplace 5 le brin complémentaire, et les deux brins sont ainsi séparés, sans qu'il soit nécessaire de procéder à une élévation de température (Figure 5j). A partir de cette étape, l'un des brins peut initier un nouveau cycle de réPLICATION, en s'hybridant avec une nouvelle amorce P2 10 (Figure 5f). L'autre subit un accroissement de taille, en doublant théoriquement sa longueur à chaque cycle (Figures 5k, 5l, 5m).

La température de réaction, qui sera maintenue constante tout au long de celle-ci, est choisie de 15 manière à permettre l'hybridation des amorces, l'équilibre des séquences répétées inversées entre la forme dépliée et la forme repliée en épingle à cheveux, et d'autre part, l'extension des brins par la polymérase choisie. Généralement cette température sera comprise 20 entre 45 et 75°C, de préférence entre 50 et 65°C.

On obtient simultanément, un brin de très haut poids moléculaire comprenant de multiples copies de la séquence-cible, et des brins de taille égale à la matrice, utilisables à leur tour comme matrice.

25 Lorsque la séquence-cible initiale est double-brin, ces étapes se déroulent simultanément pour chacun des brins, exactement selon le même processus, en intervertissant simplement le rôle des amorces P1 et P2.

30 Lorsque l'ADN cible initial est en petite quantité, il est bien entendu possible de réaliser, préalablement à la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, une amplification classique de type exponentiel par PCR, en effectuant plusieurs cycles thermiques de dénaturation/renaturation au début de la 35 manipulation, de façon à augmenter le nombre de molécules

initiales qui subiront l'accroissement lors de l'étape isotherme ultérieure.

Une agitation modérée peut permettre également d'augmenter le nombre de molécules : dès qu'il atteint 5 une taille suffisante, l'ADN a tendance à se fragmenter spontanément et chaque fragment peut être à la base de nouveaux cycles d'accroissement.

Les coupures qui ont lieu au centre de la séquence-cible conduisent à un arrêt de l'accroissement. 10 Les coupures qui ont lieu au voisinage des séquences palindromiques permettent au contraire à l'accroissement de se poursuivre.

Dans une autre manière de réaliser l'invention, on peut aussi utiliser une endonucléase 15 thermostable coupant l'amorce au voisinage de la séquence palindromique.

Parmi les ADN polymérases utilisables pour la mise en oeuvre de la présente invention, on citera l'ADN polymérase de E.Coli, préférentiellement le fragment de 20 Klenow, ou une ADN polymérase de phage bactérien (ex:T4) ou une ADN polymérase de levure (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, par exemple).

Avantageusement, on utilisera une ADN polymérase extraite d'un organisme mésophile, par exemple 25 de certaines levures ou micro-organisme industriels, qui croissent aux alentours de 50 °C.

Si l'on souhaite travailler à température relativement élevée, on peut soit utiliser une ADN polymérase thermostable, telle que la Taq polymérase, 30 soit utiliser l'ADN polymérase en excès, soit en rajouter après chacune des deux étapes de chauffage nécessaires à la dénaturation de l'ADN préalablement à la mise en oeuvre de la méthode d'accroissement conforme à l'Invention.

35 Dans certaines conditions, il arrive que certaines ADN polymérases n'achèvent pas totalement la

réPLICATION du brin d'ADN dont elles effectuent la copie. Après quelques cycles, la capacité de former des épingleS à cheveux disparaît, et l'accroissement s'arrête. On peut prévenir ce phénomène en plaçant plusieurs séquences répétées inversées à la suite les unes des autres. Des exemples de réalisation sont donnés en figures 4a et 4b.

De toutes façons, après 8 ou 9 cycles d'accroissement, le facteur limitant est le temps, car le doublement de la taille des produits d'accroissement nécessite une durée de plus en plus longue.

Les produits d'accroissement résultant de la mise en oeuvre de la méthode conforme à l'invention ont une taille importante : une molécule d'ADN produite par accroissement d'une séquence-cible de 400 paires de bases aurait une taille (théorique) de 409 kb après seulement dix cycles d'accroissement. En fait, ces produits d'accroissement sont cassés par l'agitation thermique, et leur taille moyenne en solution est d'environ 60 kilobases. En conséquence, le comportement physique des produits d'accroissement, (même cassés) diffère énormément de celui des amorces, et même de celui de l'ADN cible, si celui-ci est de petite taille (virus par exemple).

Dans une manière particulière de réaliser l'invention, la réaction est réalisée dans une solution contenant une faible concentration d'un composé gélifiable (gel d'agarose ou de polyacrylamide ou d'un polymère convenable: il peut s'agir par exemple d'un gel thermofusible tel que de l'agarose à 0,2%). On peut aussi ajouter la solution de composé gélifiable à la fin de la réaction.

On peut aussi par exemple, placer une bille d'agarose à forte concentration dans chaque puits de plaques de microtitration. On fond cette bille par un passage à 80/90°C en fin de réaction, on agite la plaque

pour mélanger les réactifs, on laisse se figer les puits (Figure 6a).

La réaction peut par exemple avoir lieu dans des plaques de microtitration à 96 puits (ou à 384 puits) 5 ou dans tout récipient de capacité convenable. A la fin de la réaction, on place les plaques à basse température (4°C) de façon à faire se figer l'agarose. Les plaques sont ensuite placées à incuber dans un grand volume d'une solution tamponnée contenant un colorant fluorescent 10 spécifique de l'ADN (Bromure d'éthidium par exemple). Les amorces diffusent à l'extérieur des puits, mais les produits d'accroissement demeurent bloqués dans les gels 15 (Figure 6b). Les puits positifs pour la présence de l'ADN recherché apparaissent donc fluorescents sous éclairage UV (Figure 6c) (ou bien lorsque l'on laisse diffuser dans ceux-ci un mélange de réactifs propres à exciter la luminescence du colorant par chimiluminescence). Il n'est donc plus nécessaire de réaliser une électrophorèse, dans ce qui permet des tests rapides. Une éventuelle 20 confirmation des tests pourra avoir lieu en effectuant une hybridation de contrôle, selon une technique connue en soi. On effectuera avantageusement cette hybridation sous forme d'une hybridation en sandwich dans le puits même où a lieu l'amplification, une sonde de capture 25 étant fixée sur le fond du puits.

L'on peut également faire suivre une réaction d'amplification par PCR par une réaction d'accroissement conforme à l'invention, de façon à profiter des avantages de la méthode de détection rapide qui vient d'être 30 décrite ci-dessus.

Une des applications de l'Invention les plus utiles est le criblage de grands nombres de composés biologiquement actifs. Ainsi, pour rechercher des produits actifs sur la transcriptase inverse du virus 35 HIV, on procédera de la manière suivante: la solution réactionnelle placée dans les puits d'une plaque de

microtitration contient des brins d'ARN, en quantité suffisante, la transcriptase inverse du virus, les amorces spécifiques de l'ADNc synthétisé par l'action de la transcriptase inverse virale sur l'ARN spécifique présent dans la solution, des nucléotides triphosphates, une ADN polymérase, un gel thermofusible (éventuellement ajouté après la fin de la réaction). Des puits servent de témoins : ils ne comporteront que ces réactifs. Dans chaque autre puits, on placera une certaine quantité des 10 composés dont on veut tester l'activité sur la transcriptase inverse du virus HIV. Avant les étapes d'accroissement génique, on incubera le mélange réactionnel aux températures physiologiques permettant l'action des transcriptases inverses. Les ADNc produits 15 de la sorte seront ensuite soumis à la réaction d'accroissement génique.

Certains puits ne présenteront pas de fluorescence, signe de la présence d'un inhibiteur de la transcriptase inverse. Cette méthode peut être aisément 20 automatisée et permettre le criblage d'un grand nombre de produits potentiellement actifs (chimiothéques, extraits de plantes, extraits d'algues, extraits de champignons, extraits animaux, etc....).

De nombreux virus et pathogènes divers 25 synthétisent une transcriptase inverse spécifique, dont l'activité leur est indispensable. Les rétrovirus, par exemple les lentivirus (HIV), les oncornavirus (HTLV), les spumavirus sont évidemment les premiers concernés. Mais le virus HBV (hépatite B) nécessite lui aussi 30 l'action d'une transcriptase inverse spécifique, bien qu'il s'agisse d'un virus à ADN. Les *Plasmodia* du paludisme synthétisent eux aussi de grandes quantités de transcriptase inverse spécifique. Il est à noter que les *Plasmodia* deviennent actuellement résistants à l'ensemble 35 des produits actifs connus dans la pharmacopée. Des inhibiteurs de toutes ces transcriptases inverses

seraient un immense secours dans la lutte contre de nombreux pathogènes. Cependant, ceux-ci sont souvent difficiles à cultiver, ce qui interdit le criblage extensif de nombreux produits. Les transcriptases inverses endogènes des eucaryotes sont elles aussi impliquées dans le processus de certaines affections. Citons pour mémoire le phénomène d'amplification des gènes de résistance aux médications de chimiothérapie observé lors du traitement de nombreux cancers.

De la même façon, l'Invention peut servir à tester l'activité des ADN polymérases.

Dans une autre manière d'appliquer l'Invention, on utilise aussi la capacité de la méthode à permettre l'amplification de l'ADN à température relativement basse, du fait qu'aucune étape de dénaturation n'est indispensable. Dans les conditions physiologiques, à l'intérieur des cellules, des cofacteurs protéiques impliqués dans les phénomènes de réPLICATION et d'expression des gènes permettent à l'hybridation des amores d'accroissement d'avoir lieu sans chauffage, bien qu'avec un rendement faible. L'ensemble de la réaction d'accroissement peut alors avoir lieu à 37°C. Cependant, l'ADN synthétisé est dégradé assez rapidement. Cependant, si l'on arrive à faire rentrer des amores d'accroissement en quantité suffisante dans les cellules, et à éviter leur dégradation, il est théoriquement possible d'altérer suffisamment les mécanismes cellulaires pour entraîner spécifiquement la mort des cellules contenant des séquences d'ADN spécifiques des amores. Cette altération a lieu par compétition avec les réactions cellulaires et épuisement de certains composés et aussi par l'action mécanique de l'ADN de haut poids moléculaire produit par la réaction d'accroissement. Par exemple, on pourrait tuer spécifiquement des cellules contenant le virus HIV

(pour épurer des prélèvements de moelle osseuse en vue d'une réimplantation par exemple).

Dans cette manière de réaliser l'Invention, on synthétisera les amorces d'amplification dans un 5 synthétiseur d'ADN en utilisant des analogues de nucléotides triphosphates conduisant à des oligonucléotides non dégradables par les enzymes cellulaires (phosphorothioates, par exemple). La charge électrique totale des amorces d'accroissement sera 10 diminuée par une méthode chimique (par couplage de groupements amines selon une méthode déjà décrite par exemple, ou en utilisant pour la synthèse des analogues de nucléotides dont la charge portée par le groupe phosphate aura été supprimée) de façon à leur permettre 15 de traverser les membranes.

Les amorces d'accroissement résistantes peuvent aussi être incluses dans les liposomes, la surface de ceux-ci comportant éventuellement des marqueurs servant à les guider spécifiquement vers une 20 catégorie de cellules particulières.

Ceci pourra par exemple être réalisé en synthétisant des liposomes comportant à leur surface des parties des protéines recombinantes de la surface du virus HIV. De tels liposomes se fixent spécifiquement aux 25 récepteurs CD4. De tels liposomes contenant de grandes quantités d'amorces d'accroissement vont aller fusionner spécifiquement avec la surface de certaines cellules (lymphocytes T4, T8, hématies, cellules du système immunitaire spécifiques de certains tissus, comme les 30 astrocytes, les cellules de Langerhans ou les plaques de Peyer). Dans les cellules contaminées par le virus HIV, la réaction d'accroissement va détourner une partie du stock de nucléotides triphosphates, cellulaires, et des enzymes du cycle de réPLICATION, diminuant le taux de 35 réPLICATION du virus. Si l'accroissement génique a lieu avec un rendement suffisant, il est possible que les

fonctions vitales de la cellule soient affectées et que la mort cellulaire soit accélérée. On a ainsi un processus mimant l'immunité cellulaire spécifique.

A titre d'exemple, on peut aussi citer la 5 possibilité de réaliser des liposomes contenant des amorces spécifiques des *Plasmodia* du paludisme (amorces spécifiques de l'ADN génomique, de l'ADN mitochondrial, kinétoplasmique ou épisomique). La surface de ces liposomes contenant les protéines recombinantes 10 spécifiques des récepteurs de surface des globules rouges (anticorps anti-A, anti-B, anti-duffy, etc....). On peut aussi utiliser les protéines recombinantes spécifiques de la surface des stades infectieux du paludisme, ou des protéines recombinantes contenant tout ou partie de la 15 protéine GP120 du HIV. En effet, la membrane des globules rouges présente dans certains cas un nombre de récepteurs CD4 résiduels suffisants pour permettre la fusion des liposomes portant des protéines réceptrices de ces récepteurs. Cependant, la méthode la plus efficace est de 20 fixer sur les protéines de surface des liposomes des anticorps anti-marqueurs de groupes sanguins (A ou B).

Une fois introduites dans les hématies, les amorces d'accroissement diffusent vers le cytoplasme de l'hématzoaire en utilisant les pores reliant celui-ci 25 avec le cytoplasme de l'hématie. L'accroissement génique interfère avec le développement de l'hématzoaire, allant jusqu'à le désorganiser.

Il est important de remarquer que le déroulement de l'accroissement génique *in vivo* se déroule 30 d'autant mieux que les cellules où cette réaction a lieu se divisent d'autant plus rapidement, ou hébergent un parasite se divisant rapidement. L'ADN est d'autant plus facilement accessible et les cofacteurs (polymérases, déroulases, topoisomérasées, protéines déstabilisantes des doubles hélices, protéines stabilisantes des simples brins, etc....) sont présents en quantité d'autant plus

grandes que les cellules sont dans un stade de division rapide. Considérant ce fait, des liposomes contenant des amorces d'accroissement correspondant à un gène donné et portant à leur surface des protéines reconnues par des 5 récepteurs membranaires spécifiques d'une certaines classe de cellules peuvent être à la base d'un traitement des tumeurs cancéreuses tuant ou inhibant la croissance de cellules cancéreuses en division rapide, et restant sans action sur les cellules normales.

10 Cette technique bénéficie donc d'une double spécificité, tissulaire d'une part, dépendant du taux de division cellulaire d'autre part.

Une autre application particulière de l'Invention est la détection prénatale du sexe des 15 enfants à naître. Il a été démontré que le chromosome Y était porteur de séquences spécifiques, pouvant être détectées par hybridation (voir notamment, Nucleotide sequence of 49 a, a genomic probe detecting multiples RFLP on the Y chromosome, Gérard LUCOTTE, Martine 20 MARIOTTI and Fabrice DAVID. Molecular & Cellular Probes, 5, 359-363, (1991). De façon précoce au cours de la grossesse, des cellules foetales traversent le placenta pour entrer dans la circulation générale de la mère. On peut mettre la présence de ces cellules en évidence grâce 25 à la PCR, mais la méthode est extrêmement sensible aux contamination dues aux poussières de laboratoire. En effet, une partie importante de ces poussières est constituée de cellules desquamées desséchées. Si des chercheurs ou des techniciens se mêlent aux techniciennes 30 dans les locaux où sont effectués les tests, tous les échantillons deviennent rapidement positifs.

Il est possible de pratiquer la méthode d'accroissement génique *in situ* sur un frottis de culot de globules blancs réalisé à partir d'un prélèvement 35 sanguin. Les cellules foetales apparaissent fluorescentes en observation aux UV. On peut aussi opérer en solution,

et dénombrer les cellules fluorescentes à l'aide d'un appareil de comptage en flux liquide.

Les produits d'accroissement peuvent également être utilisés comme marqueurs de taille lors 5 d'expériences d'électrophorèse en champ pulsé. On mélangera les produits de réaction d'accroissement obtenus après des temps de réaction variables, la fin de chaque réaction étant conduite à température relativement basse. On ajoute au mélange de l'agarose pour éviter la 10 fragmentation de l'ADN par les forces de cisaillement. Le mélange obtenu pourra être commercialisé tel quel, prêt à l'emploi, sous forme de petites lamelles d'agarose solide de la taille des puits du système d'électrophorèse. Après dépôt dans un puits et électrophorèse, on obtiendra une 15 série de bandes correspondant à des fragments d'ADN de taille multiple de celle de l'ADN amplifié, et de séquence parfaitement connue.

La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se 20 réfère à un exemple de mise en oeuvre du procédé conforme à l'Invention.

Il doit être bien entendu toutefois que cet exemple est donné uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'Invention dont il ne constitue en aucune 25 manière une limitation.

Exemple : Amplification et détection d'une séquence spécifiques du virus HIV:

L'ADN cible est un vecteur contenant une séquence du gène gag de HIV.

30 On utilise les oligonucléotides suivants, qui permettent l'amplification d'une portion du gène gag de HIV. Cette partie est relativement conservée parmi les différentes souches.

**A1:**

35 C G TGGTCATACGAACTACATTTCAGA 5'

T A ACCAGTATGCTTGATGTAAAGTCT ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT 3'

**A2:**

C G CGTCAGAATTCTTCACTAATTAGC 5'

T A GCAGTCTTAAGAAGTGATTAATCG TTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGAATGC 3'

5 Ces oligonucléotides comprennent, de 5' en 3' : une séquence répétée inversée, autour d'une séquence GCTA, qui permet le repliement de la structure en épingle à cheveux, et une séquence spécifique du gène *gag*.

10 Les séquences répétées inversées ont été choisies de manière à avoir une Tm de 66°C ; elles ont été composées par tirage au sort.

Les séquences spécifiques de la partie GAG du génome HIV ont une Tm de 78°C

Environ  $10^5$  à  $10^6$  copies du plasmide cible contenant le gène *gag* HIV sont utilisées.

15 La réaction est effectuée dans les conditions standard de PCR, soit:

200 pmol. de chaque amorce

20mM Tris HCl (ph 8,3)

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

20 25 mM KCl

0,05% Tween 20

100 µg/ml de gélatine autoclavée.

50 µM de chaque dNTP

3 unités de Taq polymérase.

25 On procède à une première dénaturation du plasmide contenant le gène *gag* HIV, par incubation à 95°C pendant 1mn;

On refroidit le mélange réactionnel et on laisse incuber pendant 5 minutes pour permettre 30 l'hybridation et l'elongation de la première amorce pour chaque brin ; on procède à une nouvelle dénaturation, à 95°C pendant 1mn.

On incube à 63°C pendant 2 heures.

On dépose le produit de la réaction sur un gel 35 d'agarose à 0,8%. En fin de migration, on observe en haut du gel dans les échantillons positifs, une bande

correspondant à l'ADN de haut poids moléculaire (supérieur ou égal à 50kb) ; en dessous, on distingue des bandes d'intensité plus faible correspondant à des ADN de taille décroissante, la taille de chaque fragment étant 5 théoriquement double de celle du fragment immédiatement en dessous : le fragment le plus petit de cette série correspond à la séquence-cible.

## REVENDICATIONS

1) Méthode d'amplification d'une séquence-cible d'acide nucléique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une étape au cours de laquelle l'on 5 procède à l'extension, au moyen d'une ADN polymérase, et en utilisant comme matrice un brin d'ADN portant ladite séquence-cible, d'au moins une amorce oligonucléotidique constituée d'une partie (3') pouvant s'hybrider spécifiquement avec la séquence-cible, et d'une partie 10 (5') comportant au moins une séquence répétée inversée.

2) Méthode d'amplification d'une séquence-cible d'acide nucléique, selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend :

a) l'hybridation de l'amorce 15 oligonucléotidique avec une matrice qui comprend la séquence-cible, flanquée en 5' d'au moins une séquence répétée inversée,

b) l'extension de ladite amorce oligonucléotidique au moyen d'une ADN polymérase, afin 20 d'obtenir un produit d'extension comprenant une séquence complémentaire de la séquence-cible, flanquée en 3' et en 5' de séquences répétées inversées ;

c) l'extension, par l'ADN polymérase, de l'amorce constituée par la séquence répétée inversée de 25 l'extrémité 3' du produit d'extension repliée en épingle à cheveux, en utilisant comme matrice ledit produit d'extension ;

d) la répétition de l'étape c) en utilisant 30 comme matrice le produit d'extension issu de cette étape, et comme amorce l'extrémité 3' dudit produit d'extension repliée en épingle à cheveux ;

l'ensemble de ces étapes étant effectuées en maintenant la température du milieu réactionnel à une valeur constante permettant l'hybridation d'une amorce, 35 et la réPLICATION de la séquence-cible.

3) Méthode selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une étape au cours de laquelle l'on procède à l'incubation d'une chaîne d'ADN comprenant la 5 séquence-cible, en présence d'une première amorce nucléotidique constituée d'une partie (3') pouvant s'hybrider spécifiquement avec ladite séquence-cible, et d'une partie (5') comportant au moins une séquence répétée inversée, dans des conditions permettant la 10 réPLICATION de ladite séquence-cible par extension de ladite amorce.

4) Méthode d'amplification selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'on ajoute au mélange réactionnel un composé 15 gélifiable capable d'emprisonner spécifiquement les produits d'amplification, tout en laissant diffuser les amorces.

5) Trousses de diagnostic contenant les amorces et les réactifs nécessaires pour leur mise en 20 oeuvre d'une méthode selon une quelconque des revendications 1 à 4.

6) Paire d'amorces pour la mise en oeuvre d'une méthode d'amplification selon une quelconque des revendications 1 à 3.

25 7) Utilisation d'une paire d'amorces selon la revendication 6 pour l'obtention d'un médicament.

1/5

**Fig. 1**

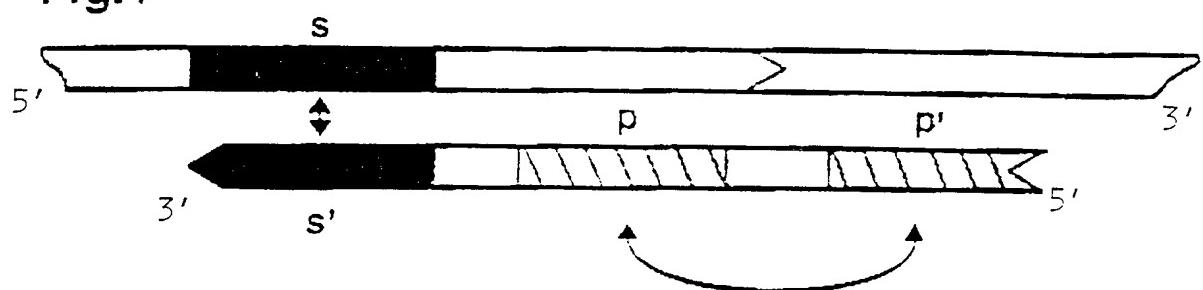


Fig. 2

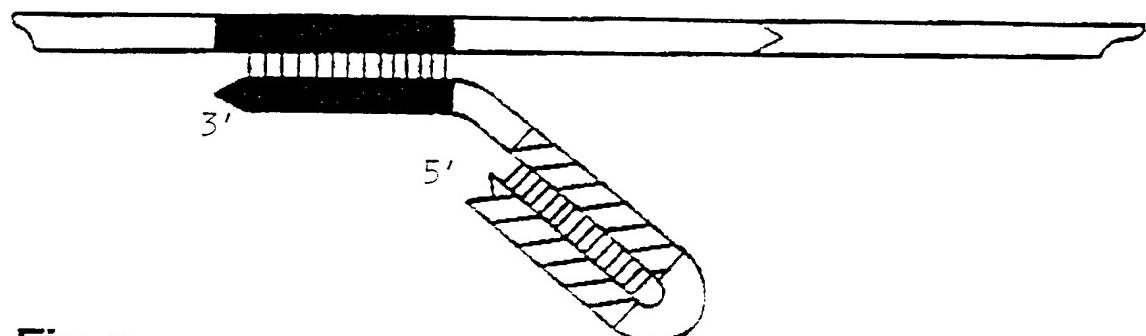


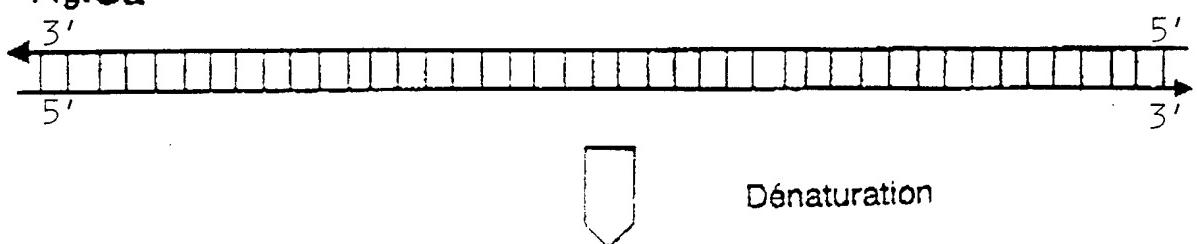
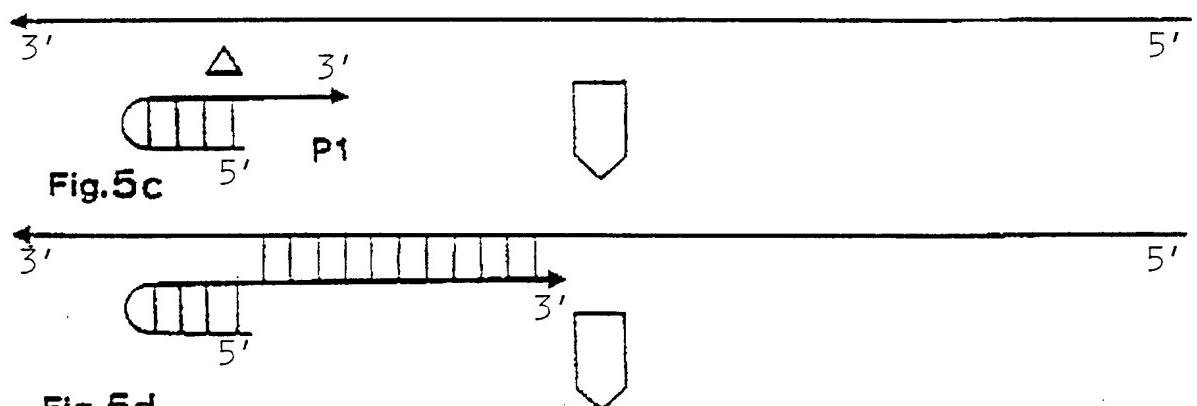
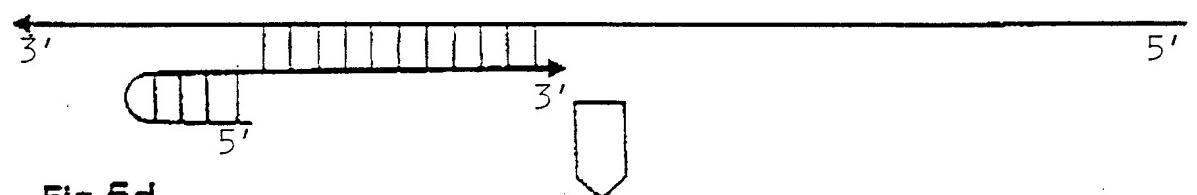
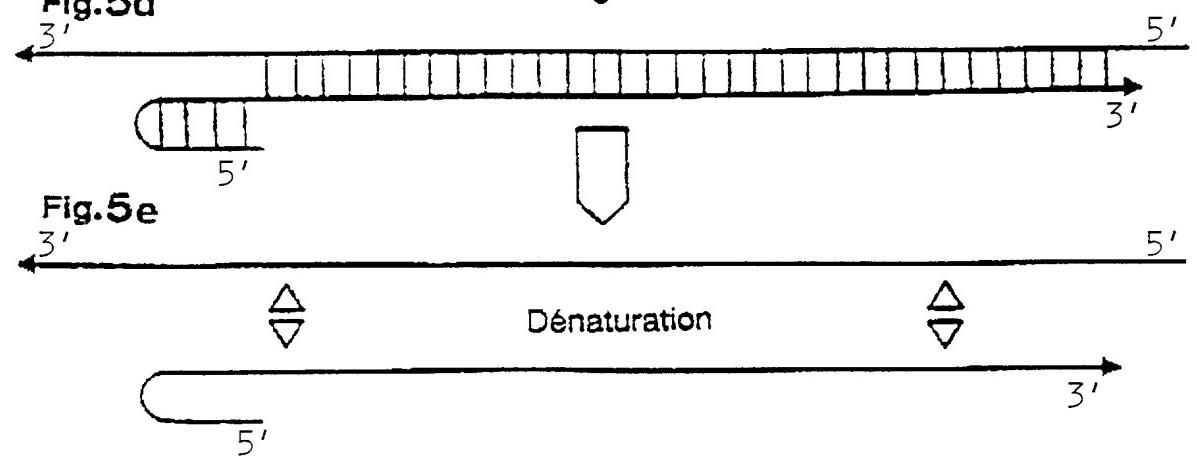
Fig. 3

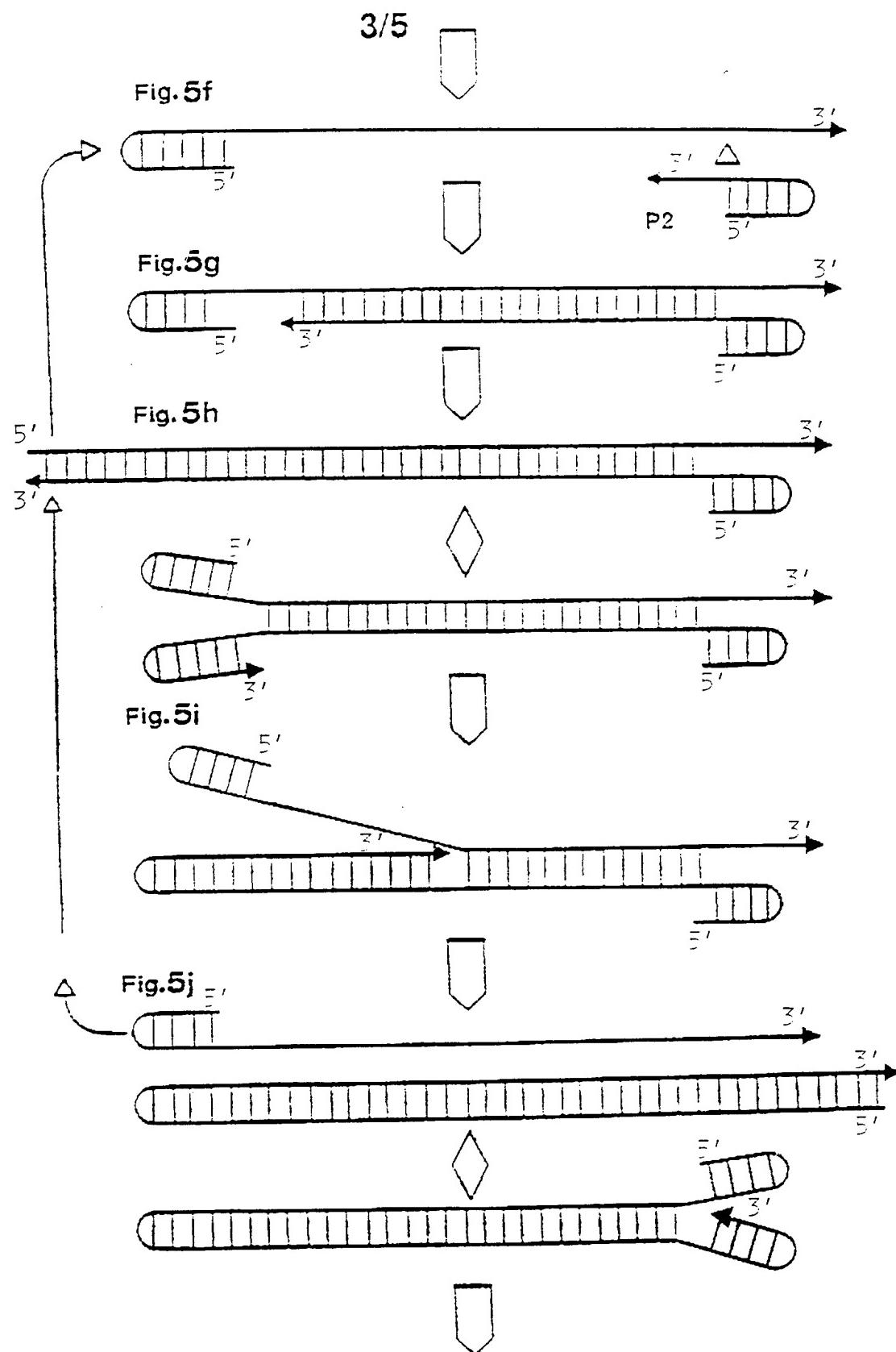
A diagram of a DNA strand. On the left, a thick black horizontal bar represents the backbone of the DNA. To its right, a sequence of nucleotides is shown as vertical bars: A (Adenine), T (Thymine), T (Thymine), T (Thymine), G (Guanine), G (Guanine), G (Guanine), C (Cytosine), C (Cytosine), C (Cytosine), A (Adenine), A (Adenine), T (Thymine), T (Thymine). Two arrows point upwards from the strand, one above the second 'T' and another above the third 'C'.

Fig. 4a

A diagram of a DNA strand. On the left, a white arrowhead points to the right, representing the 3' end of the strand. The strand itself is a black line with a vertical tick mark at its center. To the right of the tick mark, the sequence "AAATTTAAATTTAAATTTAAATTT" is written above "TTTAAATTTAAATTTAAATTTAAA". On the far right, a black arrowhead points to the left, representing the 5' end of the strand.

2/5

**Fig.5a****Fig.5b****Fig.5c****Fig.5e**



4/5

Fig.5k

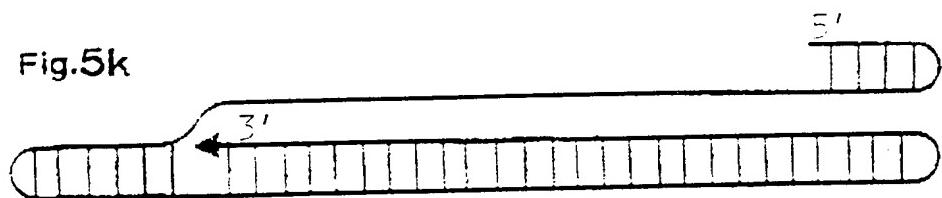


Fig.5l

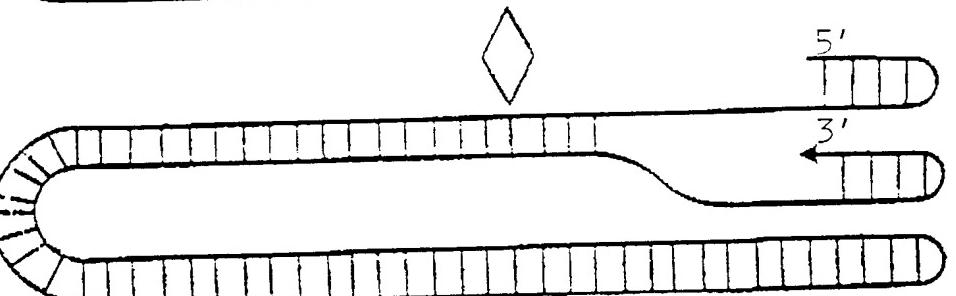
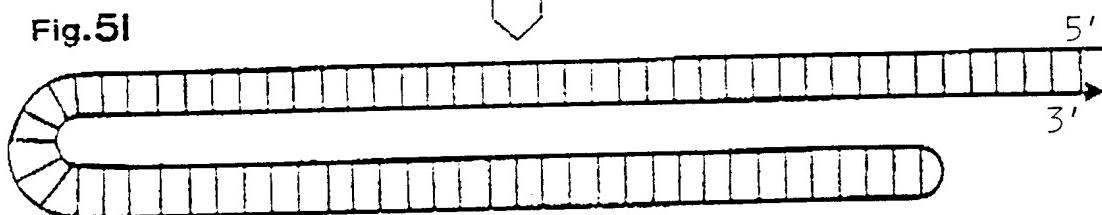
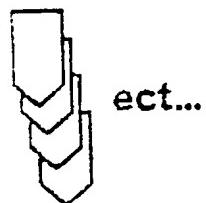
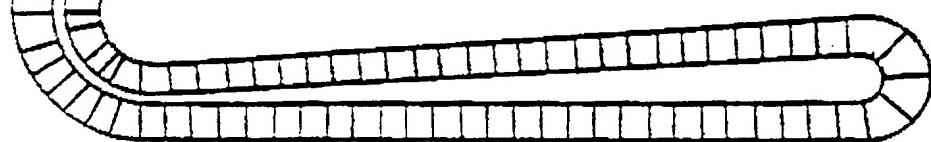
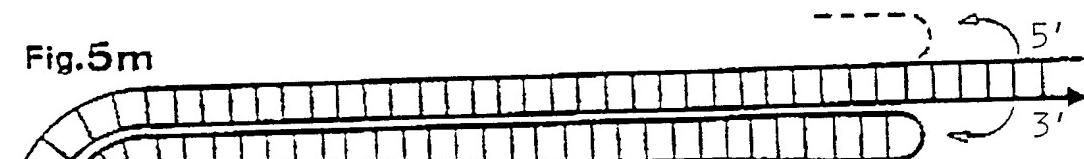


Fig.5m



ect...

5/5

Fig.6 a

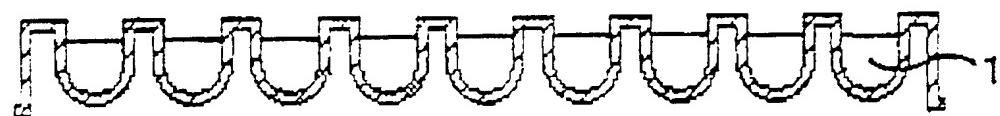
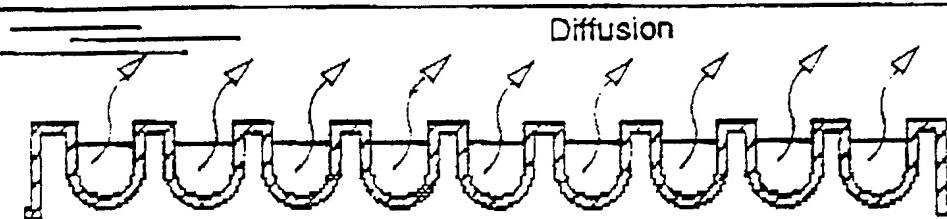


Fig.6b



Diffusion

UV proche

Fluorescence

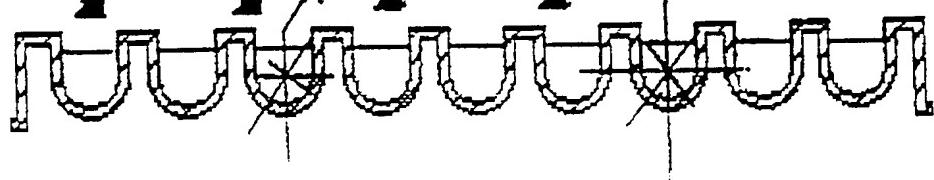


Fig.6c

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/00891

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/68 A61K48/00 C12N15/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 427 074 (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC.) 15 May 1991 see page 6, line 49 - page 8, line 35; figure 5 ---	1-3,5-7
X Y	EP,A,0 549 107 (SYNTEX INC.) 30 June 1993 see figure 5; examples 1-4 ---	1-3,5-7 4
X	EP,A,0 530 112 (UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEW JERSEY) 3 March 1993 see page 2, line 40 - page 3, line 32 see page 7, line 35 - page 10, line 12 see page 12, line 19 - line 30 ---	1-3,5-7
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 October 1995

Date of mailing of the international search report

16.11.95

## Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

## Authorized officer

Gurdjian, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern	al Application No
PCT/FR 95/00891	

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DNA AND CELL BIOLOGY, vol. 13, page 75 VINCENT, JOHN ET AL 'Oligonucleotides as short as 7-mers can be used for PCR amplification' see the whole document ---	1-3,5-7
A	GENE ANALYSIS TECHNIQUES, vol. 6, page 29 SRIPRAKASH, K. S. ET AL 'Hairpin extension: a general method for the improvement of sensitivity of oligonucleotide probes' see the whole document ---	1-3,5-7
A	BIOTECHNOLOGY, vol. 12, NEW YORK US, page 619 G.CAETANO-ANOLLES ET AL. 'DNA amplification...' see the whole document ---	1-3,5-7
Y	BIO/TECHNOLOGY, 1990, vol. 8, 1990 pages 1288-1290, ALLEN R C ET AL 'Rehydratable gels: a potential reference standard for electrophoresing PCR-amplified DNA' see the whole document -----	4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internal Application No  
PCT/FR 95/00891

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0427074	15-05-91	AU-B-	642922	04-11-93
		AU-B-	6594990	16-05-91
		IL-A-	96250	07-10-94
		JP-A-	4008292	13-01-92
-----	-----	-----	-----	-----
EP-A-0549107	30-06-93	CA-A-	2080305	12-04-93
		JP-A-	7143900	06-06-95
-----	-----	-----	-----	-----
EP-A-0530112	03-03-93	CA-A-	2073630	01-03-93
		JP-A-	5308972	22-11-93
		WO-A-	9420639	15-09-94
-----	-----	-----	-----	-----

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 95/00891

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12Q1/68 A61K48/00 C12N15/88

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP,A,0 427 074 (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC.) 15 Mai 1991 voir page 6, ligne 49 - page 8, ligne 35; figure 5 ---	1-3,5-7
X Y	EP,A,0 549 107 (SYNTEX INC.) 30 Juin 1993 voir figure 5; exemples 1-4 ---	1-3,5-7 4
X	EP,A,0 530 112 (UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEW JERSEY) 3 Mars 1993 voir page 2, ligne 40 - page 3, ligne 32 voir page 7, ligne 35 - page 10, ligne 12 voir page 12, ligne 19 - ligne 30 ---	1-3,5-7
	-/-	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 Octobre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16.11.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax. (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gurdjian, D

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 95/00891

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DNA AND CELL BIOLOGY, vol. 13, page 75 VINCENT, JOHN ET AL 'Oligonucleotides as short as 7-mers can be used for PCR amplification' voir le document en entier ---	1-3,5-7
A	GENE ANALYSIS TECHNIQUES, vol. 6, page 29 SRIPRAKASH, K. S. ET AL 'Hairpin extension: a general method for the improvement of sensitivity of oligonucleotide probes' voir le document en entier ---	1-3,5-7
A	BIOTECHNOLOGY, vol. 12, NEW YORK US, page 619 G.CAETANO-ANOLLES ET AL. 'DNA amplification...' voir le document en entier ---	1-3,5-7
Y	BIO/TECHNOLOGY, 1990, vol. 8, 1990 pages 1288-1290, ALLEN R C ET AL 'Rehydratable gels: a potential reference standard for electrophoresing PCR-amplified DNA' voir le document en entier -----	4

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dema Internationale No  
PCT/FR 95/00891

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0427074	15-05-91	AU-B- 642922 AU-B- 6594990 IL-A- 96250 JP-A- 4008292	04-11-93 16-05-91 07-10-94 13-01-92
EP-A-0549107	30-06-93	CA-A- 2080305 JP-A- 7143900	12-04-93 06-06-95
EP-A-0530112	03-03-93	CA-A- 2073630 JP-A- 5308972 WO-A- 9420639	01-03-93 22-11-93 15-09-94